

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

IN RE APPLICATION OF: Bernard DELOBEL, et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HEREWITH

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/FR99/01085

INTERNATIONAL FILING DATE: 07 May 1999

FOR: USE OF POLYPEPTIDE DERIVED FROM A PA1b LEGUME ALBUMEN AS  
INSECTICIDE

**REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119**  
**AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**

Assistant Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that  
the applicant claims as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NO.</u>	<u>DAY/MONTH/YEAR</u>
FRANCE	98/05877	11 May 1998

A certified copy of the corresponding Convention application(s) was submitted to the  
International Bureau in PCT Application No. **PCT/FR99/01085**. Receipt of the certified  
copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been  
acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,  
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,  
MAIER & NEUSTADT, P.C.



**22850**

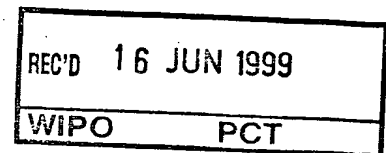
Norman F. Oblon  
Attorney of Record  
Registration No. 24,618  
Surinder Sachar  
Registration No. 34,423

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



FR99/085

# BREVET D'INVENTION

**CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION**

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le **31 MAI 1999**

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS Cédex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04  
Télécopie : 01 42 93 59 30

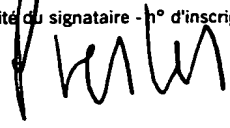
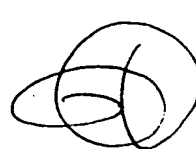
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

DATE DE REMISE DES PIÈCES <b>11. MAI 1998</b> N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL DÉPARTEMENT DE DÉPÔT <b>95</b> <b>98 05877-</b> DATE DE DÉPÔT <b>11.05.98</b>		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE  CABINET ORES 6 avenue de Messine 75008 PARIS FRANCE  n° du pouvoir permanent références du correspondant téléphone MJPsd539/82 01.45.62.75.00	
2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle <input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> demande divisionnaire <input type="checkbox"/> certificat d'utilité <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen <input type="checkbox"/> demande initiale <input type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> certificat d'utilité n° Établissement du rapport de recherche <input type="checkbox"/> diffère <input checked="" type="checkbox"/> immédiat Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non Titre de l'invention (200 caractères maximum)  UTILISATION D'UN POLYPEPTIDE DERIVE D'UNE ALBUMINE PA1b DE LEGUMINEUSE COMME INSECTICIDE			
3 DEMANDEUR (S) n° SIREN code APE-NAF Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination  1/ INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE 2/ INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE LYON  Nationalité (s) 1/ et 2/ FRANCAISE Adresse (s) complète (s) 1/ 147 rue de l'Université 75341 PARIS CEDEX 07 2/ 20 avenue Albert Einstein 69621 VILLEURBANNE		Forme juridique  Pays FRANCE FRANCE	
4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée			
5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES <input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois <input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission			
6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE pays d'origine numéro date de dépôt nature de la demande			
7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n° date n° date			
8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (nom et qualité du signataire - n° d'inscription)  VIALLE-PRESLES Marie-José (N° 93-2009)		SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI   	

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg

75800 Paris Cédex 08

Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

**MJPcb539/82FR**

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

**98 05877**

TITRE DE L'INVENTION :

**UTILISATION D'UN POLYPEPTIDE DERIVE D'UNE ALBUMINE PA1b DE  
LEGUMINEUSE COMME INSECTICIDE**

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

**CABINET ORES  
6, avenue de Messine  
75008 PARIS**

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

- **DELOBEL Bernard**  
37, rue Lakanal  
69100 VILLEURBANNE, FRANCE
- **GRENIER Annie**  
6, rue des Mésanges  
69680 CHASSIEU, FRANCE
- **GUEGUEN Jacques**  
La Croix de la Bauche, Chemin du Bourg  
44240 LA CHAPELLE SUR ERDRE, FRANCE
- **FERRASSON Eric**  
8, rue Samuel de Champlain  
44300 NANTES, FRANCE
- **MBAILAO Mbaiguinam**  
FSEA, BP 1027  
N'DJAMENA, TCHAD

**NOTA** : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

**Paris, le 5 mai 1999**

**M.-J. VIALLE-PRESLES (n° 93-2009)**



UTILISATION D'UN POLYPEPTIDE DERIVE D'UNE ALBUMINE PA1b  
DE LEGUMINEUSE COMME INSECTICIDE

---

La présente invention concerne des protéines insecticides et leur utilisation pour la protection des plantes, et en particulier des céréales, de leurs graines et des produits dérivés de celles-ci contre les insectes ravageurs.

Des insectes ravageurs des graines de céréales se rencontrent dans différentes familles, en particulier parmi les Coléoptères, des Lépidoptères et des Homoptères. Chez les Coléoptères, on citera en particulier les charançons des grains (*Sitophilus oryzae*, *Sitophilus zeamais*, *Sitophilus granarius*), ainsi que *Tenebrio* spp., *Rhyzopertha dominica*, *Trogoderma* spp., *Tribolium confusum*. Chez les Lépidoptères, on citera en particulier *Sitotroga cerealella* et *Ephestia kuehniella*.

Les ravageurs de graines de céréales sont parmi les principaux ennemis des récoltes qu'ils attaquent au champ (au moins dans les régions chaudes), et surtout dans les silos de conservation ; ils peuvent également attaquer les produits transformés dérivés de céréales (par exemple farines, semoules, etc.) Ces insectes causent des dégâts très importants et sont chaque année à l'origine de la destruction d'une partie importante (pouvant avoisiner 25%) de la récolte mondiale de céréales récoltées chaque année.

Pour lutter contre ces insectes, différentes méthodes ont été préconisées. L'utilisation d'insecticides (LINDANE®, puis MALATHION® et bromure d'éthylène) est actuellement remise en question, du fait des problèmes posés par la présence de résidus de ces produits dans l'alimentation. En outre, des résistances à ces produits sont apparues chez de nombreux insectes cibles, ce qui rend leur utilisation de moins en moins efficace. Pour remplacer ces insecticides ou limiter leur usage, différentes méthodes ont été proposées [pour

revue, cf par exemple F.H ARTHUR, J. Stored Prod. Res.,  
 32, pp. 293-302, (1996)]. Les plus développées  
 actuellement sont des méthodes physiques, telles que le  
 refroidissement des silos, la conservation sous CO<sub>2</sub> ou  
 5 sous azote ; ces méthodes sont toutefois onéreuses, et  
 leur mise en œuvre, qui nécessite une haute technicité,  
 est délicate ; elles ne sont donc pas applicables  
 partout.

Un autre type d'approche, qui fait l'objet de  
 10 nombreuses recherches, consiste à produire des plantes  
 transgéniques exprimant un ou plusieurs gène(s) leur  
 conférant une résistance contre l'attaque des insectes.  
 Cependant, cette approche nécessite que l'on dispose de  
 gènes appropriés, qui doivent en outre être acceptables à  
 15 la fois pour l'environnement et par les consommateurs.

La plupart des insectes présentent une  
 spécificité alimentaire plus ou moins stricte ; c'est  
 ainsi que les graines de céréales sont attaquées par les  
 charançons des grains (*Sitophilus oryzae*, *Sitophilus*  
 20 *zeamais*, *Sitophilus granarius*), qui n'attaquent pas les  
 graines de légumineuses ; par contre, d'autres ravageurs,  
 tels que les bruches, attaquent les légumineuses, mais  
 pas les céréales.

Des travaux précédents de l'équipe des  
 25 Inventeurs [DELOBEL et GRENIER, J. Stored Prod. Res., 29,  
 pp. 7-14, (1993)], ont montré que les trois espèces de  
*Sitophilus* mentionnées ci-dessus pouvaient se développer  
 sur des châtaignes ou des glands, mais qu'en revanche  
 elles mouraient rapidement sur pois cassés, cette  
 30 mortalité étant consécutive à la consommation des pois  
 par ces charançons.

Les Inventeurs ont entrepris de rechercher la  
 substance toxique responsable de cette mortalité. Il est  
 par ailleurs connu que les légumineuses renferment  
 35 plusieurs substances entomotoxiques, et qu'il existe chez  
 diverses espèces d'insectes pour lesquelles les

légumineuses sont toxiques, des sous-populations naturelles plus ou moins résistantes à la toxicité des légumineuses.

---

Par exemple, dans le cas des charançons des grains, un test effectué par l'équipe des Inventeurs sur 90 souches d'origines géographiques différentes, a montré que 4 souches appartenant à l'espèce *Sitophilus oryzae* comportaient des individus capables de survivre sur pois cassés au stade adulte ; en revanche, aucune souche possédant cette faculté n'a été mise en évidence chez les espèces *Sitophilus zeamais*, ou *Sitophilus granarius* ; l'étude du déterminisme génétique de cette résistance a montré que ce caractère est monogénique, récessif et autosomal [GRENIER et al., Heredity, 79, pp. 15-23, (1997)].

Les Inventeurs ont sélectionné une souche de *S. oryzae* homozygote pour ce gène de résistance, et ont utilisé cette souche pour rechercher la substance toxique vis-à-vis de laquelle se manifestait le mécanisme de résistance codé par ce gène.

Les Inventeurs ont ainsi constaté que cette toxicité était associée aux isoformes d'une protéine, de séquence similaire à celle de l'albumine de pois PA1b décrite par HIGGINS et al., [J. Biol. Chem., 261(24), pp. 11124-11130, (1986)], et présentant une forte similitude (65% d'identité) avec la leginsuline de soja [WATANABE et al., Eur. J. Biochem., 15, pp. 224:1-167-72, (1994)]. Aucune propriété entomotoxique n'avait jusqu'à présent été associée à la protéine PA1b, à la leginsuline ou à d'autres protéines homologues.

L'alignement de la séquence de l'une des isoformes de la protéine purifiée par les Inventeurs, avec celles de la protéine PA1b de pois, publiée par HIGGINS et al. et de la leginsuline de soja publiée par WATANABE et al., est représentée sur la Figure 7. Ces 3

séquences comportent en particulier 6 résidus cystéines occupant des positions conservées.

La présente invention a pour objet l'utilisation en tant qu'insecticide, d'un polypeptide  
5 comprenant une séquence répondant à la formule générale (I) suivante :



dans laquelle C représente un résidu cystéine,  $X_1$  représente un acide aminé ou une séquence de 2 à 10  
10 acides aminés,  $X_2$  représente un acide aminé ou une séquence de 2 à 5 acides aminés,  $X_3$  représente une séquence de 4 à 10 acides aminés,  $X_4$  représente une séquence de 3 à 10 acides aminés,  $X_5$  représente un acide aminé ou une séquence de 2 à 4 acides aminés,  $X_6$   
15 représente une séquence de 7 à 15 acides aminés,  $X_7$  représente un acide aminé ou une séquence de 2 à 10 acides aminés.

De préférence,  $X_1$  représente un dipeptide,  $X_2$  représente un tripeptide,  $X_3$  représente un heptapeptide,  $X_4$   
20 représente un tétrapeptide,  $X_5$  représente un acide aminé,  $X_6$  représente un nonapeptide, et  $X_7$  représente un pentapeptide.

Avantageusement :

- $X_1$  répond à la séquence  $y_1y_2$  dans laquelle  $y_1$  et  $y_2$   
25 représentent chacun un acide aminé choisi parmi l'alanine, la sérine, la glycine, et la thréonine, ou bien  $y_1$  représente un acide aminé choisi parmi l'alanine, la sérine, la glycine, et la thréonine, et  $y_2$  représente l'acide glutamique ou l'acide aspartique ; et/ou
- 30 -  $X_2$  répond à la séquence  $y_3y_4y_5$  dans laquelle  $y_3$  représente la glutamine ou l'asparagine, et  $y_4$  et  $y_5$  représentent chacun un acide aminé choisi parmi l'alanine, la sérine, la glycine, la thréonine, la valine, la leucine, l'isoleucine, et la méthionine ;  
35 et/ou

- $X_3$  répond à la séquence  $y_6y_7y_8y_9y_{10}y_{11}y_{12}$  dans laquelle  $y_6$  représente un acide aminé choisi parmi l'alanine, la sérine, la glycine, et la thréonine,  $y_7$ ,  $y_{11}$ , et  $y_{12}$  représentent chacun la proline,  $y_8$  représente un acide aminé choisi parmi la phénylalanine, le tryptophane, et la tyrosine,  $y_9$  représente l'acide aspartique ou l'acide glutamique,  $y_{10}$  représente un acide aminé choisi parmi la valine, la leucine, l'isoleucine, et la méthionine ; et/ou
- 10 -  $X_4$  répond à la séquence  $y_{13}y_{14}y_{15}y_{16}$ , dans laquelle  $y_{13}$ ,  $y_{14}$ ,  $y_{15}$ ,  $y_{16}$  représentent chacun un acide aminé choisi parmi l'alanine, la sérine, la glycine, et la thréonine, ou bien  $y_{14}$  représente un acide aminé choisi parmi l'alanine, la sérine, la glycine, et la thréonine,  $y_{13}$  et  $y_{15}$  représentent chacun un acide aminé basique, et  $y_{16}$  représente l'acide aspartique ou l'acide glutamique ; et/ou
- $X_5$  représente un acide aminé basique ; et/ou
- $X_6$  répond à la séquence  $y_{17}y_{18}y_{19}y_{20}y_{21}y_{22}y_{23}y_{24}y_{25}$ , dans laquelle  $y_{17}$ ,  $y_{19}$ ,  $y_{21}$ , et  $y_{23}$  représentent chacun un acide aminé choisi parmi la valine, la leucine, l'isoleucine, et la méthionine,  $y_{18}$  représente la proline,  $y_{20}$  et  $y_{24}$  représentent chacun un acide aminé choisi parmi l'alanine, la sérine, la glycine, et la thréonine,  $y_{22}$  représente un acide aminé choisi parmi la valine, la leucine, l'isoleucine, la méthionine, la phénylalanine, le tryptophane, et la tyrosine, et  $y_{25}$  représente un acide aminé choisi parmi la phénylalanine, le tryptophane, et la tyrosine ; et/ou
- 20
- 25
- 30 -  $X_7$  répond à la séquence  $y_{26}y_{27}y_{28}y_{29}y_{30}$  dans laquelle  $y_{26}$  représente un acide aminé basique, ou un acide aminé choisi parmi la valine, la leucine, l'isoleucine, et la méthionine,  $y_{27}$  représente l'asparagine ou la glutamine ou un acide aminé basique,  $y_{28}$  représente la proline, et  $y_{29}$  et  $y_{30}$  représentent chacun un acide aminé choisi parmi l'alanine, la sérine, la glycine, et la thréonine.
- 35

Selon un mode de mise en oeuvre préféré de la présente invention, le polypeptide utilisé comme insecticide présente au moins 40%, de préférence au moins 60% d'homologie avec une quelconque des isoformes d'une albumine PA1b.

Au sens de la présente invention, on entend par : « albumine PA1b » non seulement toute isoforme de la protéine PA1b de pois, mais également toute protéine de la même famille présente chez d'autres plantes, notamment des légumineuses, ou des Méliacées, telles que *Khaya senegalensis*.

Des polypeptides utilisables conformément à l'invention, peuvent être des polypeptides naturels, par exemple les leginsulines de légumineuses, telle que la leginsuline de soja décrite par WATANABE et al. ; il peut s'agir également de polypeptides artificiels dont la séquence est dérivée de celle d'une PA1b par l'addition, la délétion, ou la substitution d'un petit nombre d'acides aminés. On peut par exemple utiliser des polypeptides comprenant une séquence répondant à la formule générale (I), ou une portion de celle-ci correspondant à la région impliquée dans l'activité insecticide. Ce peptide actif peut éventuellement être fusionné à son extrémité N-terminale et/ou à son extrémité C-terminale avec une autre séquence peptidique.

Ces polypeptides peuvent être obtenus par les méthodes classiques, connues en elles-mêmes, par exemple par synthèse peptidique, ou par génie génétique, en exprimant, dans une cellule-hôte appropriée une séquence codant pour le polypeptide souhaité. Ils peuvent également, dans le cas des polypeptides naturels, tels que la PA1b et la leginsuline, être purifiés à partir de graines de plantes telles que des légumineuses ou des Méliacées.

Conformément à l'invention, les polypeptides comprenant une séquence de formule générale (I) peuvent

être utilisés en tant que seul principe actif d'un insecticide, ou bien associés à un ou plusieurs autres principes actifs. Ils peuvent être utilisés en particulier, pour lutter contre les insectes ravageurs des graines de céréales, et également contre des insectes phytophages, tels que les lépidoptères *Mamestra brassicae* ou *Ostrinia nubilalis* ou les coléoptères *Chrysomélidae* comme *Phaedon cochleariae* ou *Curculionidae* comme *Anthonomus grandis* ou contre des Insectes phloemophages tels que les pucerons.

En outre, les Inventeurs ont constaté que la protéine PA1b conservait son activité insecticide pendant plusieurs années dans les graines sèches, et que cette activité n'était pas affectée par un chauffage à 100°C.

D'autre part, cette protéine n'est pas toxique pour l'homme ou les animaux supérieurs ; elle est présente dans les légumineuses qui font partie de leur alimentation habituelles.

Les polypeptides de séquence générale (I), sont particulièrement bien adaptés pour la protection, en particulier pendant le stockage, des graines, des farines, ou des produits transformés qui en sont dérivés.

Pour la mise en œuvre de la présente invention, la concentration du polypeptide de séquence (I) au niveau du produit à protéger (plante, graines, ou produits dérivés) est généralement de 10µM à 100mM/kg, et avantageusement de 50µM à 10mM/kg.

Selon un mode de mise en oeuvre préféré de la présente invention, on traite le produit à protéger avec une préparation comprenant ledit polypeptide. Celui-ci peut par exemple être sous forme d'une préparation purifiée ou d'une fraction enrichie, qui peuvent notamment être obtenues à partir de graines de plantes produisant naturellement ledit polypeptide, ou bien à partir de cultures de cellules exprimant un gène codant pour ce polypeptide.

Selon un autre mode de mise en oeuvre préféré de la présente invention, on produit une plante transgénique, transformée par au moins un gène codant pour ledit polypeptide, et exprimant ce dernier dans au moins un de ses tissus ou organes.

La présente invention englobe également les plantes transgéniques produites de la sorte ; avantageusement, lesdites plantes sont des céréales.

Ces plantes peuvent être obtenues par les techniques habituelles de transgénèse végétale, qui sont connues en elles-mêmes.

Il est ainsi possible d'obtenir dans une plante une expression ubiquitaire et/ou une expression ou une surexpression dans certains tissus ou organes (par exemple dans les graines) d'un polypeptide de séquence (I), et de ce fait de protéger la plante, le tissu ou l'organe concerné, contre les attaques d'insectes pour lesquels ce polypeptide est toxique. En particulier, l'expression d'un polypeptide de séquence (I) dans les graines permet de protéger celles-ci, même après la récolte, ainsi que les farines et les produits transformés obtenus à partir de ces graines.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre qui se réfère à des exemples non-limitatifs, décrivant la purification et illustrant les propriétés insecticides d'une albumine PA1b de légumineuse.

#### **EXEMPLE 1 : MISE EN EVIDENCE DE LA TOXICITE DE DIFERENTES FARINES DE LEGUMINEUSES POUR DES CHARANCONS DES CEREALES**

La toxicité de farines de différentes légumineuses a été testée sur des charançons (*Sitophilus oryzae*). Les expérimentations ont été effectuées en parallèle sur des animaux de type sauvage (souche sensible S), et sur des mutants survivant à l'alimentation sur pois (souche résistante R).



Les charançons (*Sitophilus oryzae*) sont élevés en enceinte régulée à 27,5°C et 70% d'humidité relative.

De jeunes adultes âgés d'une semaine sont prélevés dans ces élevages de masse pour les tests. Pour chaque test,  
 5 des lots de 30 insectes sont mis en expérimentation, et la mortalité journalière est notée.

Des boulettes de farine sont pétries avec de l'eau, mises à sécher 24 h, et utilisées pour l'alimentation des charançons. La farine grise de blé  
 10 utilisée est complétée avec différentes proportions de farine de légumineuse, tamisée à 0,2 mm d'ouverture de maille.

Les courbes dose-réponse de mortalité des charançons ont été obtenues en utilisant différentes  
 15 doses de chaque farine à tester. Les résultats sont traités par le programme « Toxicologie » [FEBVAY et RAHBÉ, « Toxicologie », un programme pour l'analyse des courbes de mortalité par la méthode des probits sur MacIntosh, Cahiers Techn. INRA, 27, pp. 77-78 (1991)]. Ce  
 20 programme utilise la transformation en Probits des mortalités cumulées et détermine l'équation de la courbe de régression et la concentration létale 50%. Ces valeurs sont déterminées après 4 et 7 jours d'exposition.

En outre, pour chaque concentration de farine  
 25 de pois, les temps létaux 50% (TL50) pour la souche sensible S ont également été calculés. La courbe d'étalonnage ainsi établie permettra de déterminer dans la suite des expérimentations, pour chaque farine ou fraction de farine testée, la concentration équivalente  
 30 en farine de pois (en % de pois dans le blé). Cette courbe est représentée sur la Figure 1.

#### Toxicité de la farine de pois :

La Figure 2 représente la mortalité cumulée pour des adultes de la souche sensible S de *Sitophilus oryzae*, sur pois (◇), et sur blé (□), en fonction du  
 35 temps d'alimentation en jours. Ces résultats montrent que

les charançons des céréales sont rapidement tués sur pois : en 8 jours, entre 90 et 100% des adultes sont morts.

La Figure 3 représente la mortalité à 6 jours de *Sitophilus oryzae* pour des boulettes à différentes concentrations de farine de poids ; la souche résistante (R) et la souche sensible (S) sont comparées. La courbe dose/réponse ainsi établie montre que, pour la souche sensible (S) on observe, dès 10% de farine de poids, 70% de mortalité en 6 jours (et 100% en 14 jours). Dans le même temps, la souche résistante (R) n'est pas affectée.

**Toxicité de farines d'autres légumineuses :**

Parmi les graines de légumineuses utilisées en alimentation humaine, 10 ont été testées pour leur action sur les charançons sensibles et résistants.

Des boulettes contenant 80% de farine de légumineuse et 20% de farine de blé ont été utilisées. La Figure 4 illustre la mortalité cumulée des charançons *Sitophilus oryzae*, souche résistante R (▦) ou souche sensible S (■), mesurée après 5 (4 A), 7 (4 B), 14 (4 C) et 20 jours (4 D) d'alimentation sur niébé (*Vigna unguiculata*) variété blanche (1) et rouge (2), pois de terre (3 : *Vigna subterranea*), lentille (4 : *Lens esculenta*), haricot (5 : *Phaseolus vulgaris*), haricot mungo (6 : *Vigna radiata*), adzuki (7 : *Vigna angularis*), fève (8 : *Vicia faba*), pois chiche (9 : *Cicer arietinum*), et lupin (10 : *Lupinus albus*).

Les résultats montrent qu'à 7 jours toutes les légumineuses sont toxiques pour la souche sensible, même si *Vigna subterranea* et *Cicer arietinum* n'ont pas encore tué tous les insectes qui y vivent ; par contre, la souche résistante ne présente pas ou très peu de mortalité. On peut donc en conclure qu'un même mécanisme à l'origine de la toxicité, est présent chez toutes ces légumineuses ; ce mécanisme apparaît en particulier comme

prédominant chez *Vigna subterranea*, *Vigna radiata* et *Cicer arietinum*.

Toutefois, l'examen des mortalités à 14 et 20 jours sur certaines légumineuses, fait apparaître pour la souche résistante une mortalité plus ou moins grande, qu'il faut donc imputer à d'autres mécanismes ; c'est en particulier le cas sur *Phaseolus vulgaris* et sur *Vigna angularis*.

## EXEMPLE 2 - PURIFICATION ET IDENTIFICATION DE LA SUBSTANCE RESPONSABLE DE LA TOXICITE CHEZ LE POIS

### Préparation d'une fraction protéique enrichie en albumines (SRA1).

La fraction enrichie en albumine est préparée à l'échelle pilote selon le protocole développé par CREVIEU et al. [Nahrung, 40(5), pp. 237-244, (1996)].

La farine de pois (10 kg) est mélangée sous agitation avec 140 litres de tampon acétate (pH 4,9), le mélange est centrifugé à 7500 t/min, le surnageant est soumis à une ultrafiltration sur membrane M5, à une température qui ne dépasse pas 25°C. Le rétentat est soumis à une diafiltration sur la même membrane, le nouveau rétentat est centrifugé à 6000 t/min pendant 20 min et le surnageant lyophilisé. La poudre obtenue (SRA1) qui représente en moyenne 1% de la masse mise en oeuvre au départ, est utilisée pour les purifications ultérieures.

A chaque étape de la purification, la toxicité des différentes fractions est déterminée selon le protocole décrit à l'exemple 1 ci-dessus.

### 30 Chromatographie d'échange d'anions

10 g de SRA1 sont mis en suspension dans 100 ml d'une solution de méthanol à 60% et agités 1 heure à 4°C. Après centrifugation (30 min, 9000 g, 4°C) le surnageant est récupéré puis le méthanol présent est éliminé à l'évaporateur rotatif. Le volume est alors

réajusté à 100 ml par de l'eau et un tampon Tris-HCl 1M (pH 8,8) de manière à obtenir une concentration finale de 50 mM en Tris-HCl. Les protéines solubles sont fractionnées par chromatographie d'échange d'anions sur une colonne (120 x 50 mm) de DEAE SEPHAROSE FAST FLOW. Les protéines adsorbées sont éluées par une concentration de 50% de tampon B (Tris-HCl 50 mM, pH 8,8 ; NaCl 500 mM) dans le tampon A (Tris-HCl 50 mM, pH 8,8). Le débit d'élution est de 20 ml/min et les fractions collectées ont un volume de 80 ml. Les protéines sont détectées par absorption à 280 nm.

Le chromatogramme est représenté sur la Figure 5. La concentration en tampon B est indiquée par la ligne discontinue. Les fractions de 80 ml correspondant aux pics sont réunies en deux fractions principales, DEAE NA et DEAE 1, indiquées sur le chromatogramme par les lignes horizontales. La fraction non adsorbée (DEAE NA) contient toute la toxicité.

Cette fraction est dialysée 72 heures contre de l'eau puis lyophilisée. On obtient ainsi environ 450 mg de la fraction DEAE NA.

#### Chromatographie HPLC phase inverse semi-préparative.

La fraction DEAE NA obtenue après chromatographie échangeuse d'anions est fractionnée par chromatographie HPLC phase inverse (RP-HPLC) sur une colonne HYPERSIL (250 x 10,5 mm) remplie de NUCLEOSIL 5 µm 300 Å greffé par une chaîne aliphatique en C18. Pour chaque chromatographie 15 mg de protéines sont déposées sur la colonne. Le débit d'élution est de 3 ml/min et les protéines sont détectées par absorption à 220 nm. Les protéines sont éluées par un gradient de tampon B (0,04% d'acide trifluoroacétique dans de l'acétonitrile) dans le mélange A (0,04% d'acide trifluoroacétique dans de l'eau) selon la séquence suivante : t=0 min, 40% de B ; t=5 min, 40% de B ; t=17 min, 48% de B ; t=18 min, 80% de B ; et t=23 min, 80% de B.

Le chromatogramme est illustré par la Figure 6. Le gradient d'acétonitrile est représenté par la ligne discontinue. La toxicité est localisée uniquement au niveau des pics F1 et PT ; les fractions correspondant à ces pics qui ont été collectées, sont représentées sur le chromatogramme par des traits horizontaux,.

Trente chromatographies successives correspondant à une quantité injectée de 450 mg de DEAE NA ont été effectuées. Les fractions ont été réunies puis lyophilisées après évaporation de l'acétonitrile et de l'acide trifluoroacétique au SPEED VAC. 4 mg de la fraction PT et 5 mg de F1 ont ainsi été obtenues. Ces fractions ont ensuite été analysées par chromatographie HPLC phase inverse (RP-HPLC).

#### 15 Chromatographie HPLC phase inverse

Le contrôle de la pureté des protéines des fractions F1 et PT est effectué par chromatographie HPLC phase inverse sur une colonne INTERCHROM (250 x 4,6 mm) remplie de NUCLEOSIL 5  $\mu$ m 100 Å greffé par une chaîne aliphatique en C18. Le débit d'élution est de 1 ml/min et les protéines sont détectées par absorption à 220 nm.

Les protéines sont éluées en 45 minutes par un gradient linéaire de 0 à 50% de mélange B (0,04% d'acide trifluoroacétique dans de l'acétonitrile) dans le mélange A (0,04% d'acide trifluoroacétique dans de l'eau).

Cette analyse montre que la fraction PT ne contient que la protéine toxique PT. La fraction F1 est plus complexe et contient deux polypeptides majeurs.

#### 30 Caractérisation des protéines présentes dans les fractions PT et F1

Les déterminations de masses ont été réalisées par spectrométrie de masse à électrospray (ES-MS). Les masses moyennes calculées à partir de 2 estimations, sont de 3741,1 Da dans le cas de PT, et de 3736 et 3941 Da pour les polypeptides de la fraction FT.

Le nombre de cystéines libres et impliquées dans les ponts disulfures, a été déterminé par alkylation de la protéine par l'iodoacétamide, avant et après réduction, et comparaison des temps de rétention en RP-HPLC et des masses en ES-MS, des protéines alkylées avec la protéine native.

La protéine non-réduite alkylée présente un temps de rétention et une masse identiques à celle de la protéine native. En revanche, la protéine réduite puis alkylée présente un temps de rétention nettement différent de celui observé pour la protéine native (30 min au lieu de 42 min), et une masse de 4089,9 Da.

Il apparaît donc que cette protéine contient 6 cystéines, qui sont toutes impliquées dans 3 ponts disulfures.

#### Séquence complète de la protéine PT

La séquence complète de la protéine PT a été établie. La masse calculée à partir des 37 résidus de la protéine est 3741,4 Da, ce qui est identique, à l'erreur de mesure près, à celle déterminée par spectrométrie de masse (3741,1 Da) pour la protéine native. La valeur calculée pour la protéine alkylée par l'iodoacétamide (4090 Da) est également équivalente à celle obtenue expérimentalement (4089,9 Da). Ces résultats démontrent l'absence de modifications post-traductionnelles (glycosylations, phosphorylations...) de la protéine.

La séquence de la protéine PT présente une très forte homologie avec celle de l'albumine de pois PA1b [HIGGINS et al, J. Biol. Chem, 261(24), pp. 11124-11130, (1986)]. Les deux séquences ne diffèrent que par le remplacement du résidu valine en position 29 dans la protéine PT par une isoleucine dans la PA1b. Une forte similitude (65% d'identité) est également observée entre la protéine PT et la leginsuline de soja [WATANABE et al., Eur. J. Biochem., 15, pp. 224:1-167-72, (1994)]. En particulier, les 6 résidus cystéine, qui jouent un rôle

essentiel dans la structure des protéines, occupent des positions conservées.

La comparaison de ces 3 séquences est illustrée par la figure 7.

5 Ces résultats permettent de conclure que la protéine responsable de la résistance du pois aux charançons des céréales est similaire à la protéine PA1b décrite par HIGGINS. Cette protéine est synthétisée sous la forme d'une préproprotéine de 130 résidus (PA1) qui  
10 subit une maturation post-traductionnelle libérant la protéine PA1b ainsi qu'une protéine de 53 résidus nommée PA1a [HIGGINS et al., J. Biol. Chem., 261(24), pp. 11124-11130, (1986)].

15 Le séquençage des 10 premiers résidus N-terminaux de chacun des polypeptides toxiques de la fraction F1 a également été réalisé. Les séquences obtenues sont identiques à celle de l'extrémité N-terminale de la protéine PT. Comme, d'autre part, les masses de ces polypeptides déterminées par ES-MS sont  
20 très proches de celle de la PT, il apparaît que ces polypeptides représentent des isoformes de la PT.

### EXEMPLE 3 - ACTIVITE ET STABILITE DES PROTEINES ENTOMOTOXIQUES EXTRAITES DU POIS

#### Activité :

25 L'activité entomotoxique des polypeptides de la fraction PT ou de la fraction F1 a été déterminée comme décrit à l'exemple 1 ci-dessus ; à la concentration de 1% dans la farine de blé (3mM), ces polypeptides ont pour le charançon une toxicité équivalente à celle de la  
30 farine de pois pure. Une concentration de 60 µM est suffisante pour empêcher toute infestation par les charançons.

#### Stabilité :

35 Les polypeptides de la fraction PT ou de la fraction F1, extraits à partir de graines sèches stockées

pendant plusieurs années, conservent leur activité entomotoxique. En outre, cette activité n'est pas affectée par un chauffage à 100°C.

**Toxicité pour différents insectes :**

5 La toxicité de la protéine PT pour la teigne de la farine *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera), et pour le puceron *Acyrtosiphon pisum* (Homoptera) a également été testée.

10 Les essais sur la teigne de la farine ont été effectués sur des larves de premier et deuxième stade d'*Ephestia kuehniella* alimentées sur des boulettes de farine de blé contenant différentes concentrations de la protéine PT (en mM par kg de farine de blé). Les résultats sont illustrés par la Figure 8.

15 (○ = Survie à 0 jour ;  
▲ = Survie à 4 jours ;  
□ = Survie à 10 jours).

Ces résultats montrent que cette protéine est très toxique, dès la concentration de 0,25mM/kg.

20 Le puceron *Acyrtosiphon pisum* (Homoptera), a été nourri sur milieu artificiel contenant différentes concentrations de la protéine PT.

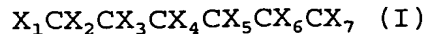
25 (□ = 3,3 µM ;  
▲ = 17 µM ;  
◆ = 46 µM ;  
○ = 84 µM ;  
■ = 100 µM).

30 Les résultats, qui sont illustrés par la Figure 9, montrent qu'une importante mortalité apparaît dès la concentration de 46 µmolaire, mortalité qui est totale à 100 µmolaire.



## REVENDICATIONS

1) Utilisation d'un polypeptide comprenant une  
séquence répondant à la formule générale (I) suivante :



5                    dans laquelle C représente un résidu cystéine,  
X<sub>1</sub> représente un acide aminé ou une séquence de 2 à 10  
acides aminés, X<sub>2</sub> représente un acide aminé ou une  
séquence de 2 à 5 acides aminés, X<sub>3</sub> représente une  
séquence de 4 à 10 acides aminés, X<sub>4</sub> représente une  
10 séquence de 3 à 10 acides aminés, X<sub>5</sub> représente un acide  
aminé ou une séquence de 2 à 4 acides aminés, X<sub>6</sub>  
représente une séquence de 7 à 15 acides aminés, X<sub>7</sub>  
représente un acide aminé ou une séquence de 2 à 10  
acides aminés,

15                    2) Utilisation selon la revendication 1,  
caractérisée en ce que X<sub>1</sub> représente un dipeptide, X<sub>2</sub>  
représente un tripeptide, X<sub>3</sub> représente un heptapeptide,  
X<sub>4</sub> représente un tétrapeptide, X<sub>5</sub> représente un acide  
aminé, X<sub>6</sub> représente un nonapeptide, et X<sub>7</sub> représente un  
20 pentapeptide.

3) Utilisation selon une quelconque des  
revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que :  
- X<sub>1</sub> répond à la séquence y<sub>1</sub>y<sub>2</sub> dans laquelle y<sub>1</sub> et y<sub>2</sub>  
représentent chacun un acide aminé choisi parmi  
25 l'alanine, la sérine, la glycine, et la thréonine, ou  
bien y<sub>1</sub> représente un acide aminé choisi parmi l'alanine,  
la sérine, la glycine, et la thréonine, et y<sub>2</sub> représente  
l'acide glutamique ou l'acide aspartique ; et/ou  
- X<sub>2</sub> répond à la séquence y<sub>3</sub>y<sub>4</sub>y<sub>5</sub> dans laquelle y<sub>3</sub>  
30 représente la glutamine ou l'asparagine, et y<sub>4</sub> et y<sub>5</sub>  
représentent chacun un acide aminé choisi parmi  
l'alanine, la sérine, la glycine, la thréonine, la  
valine, la leucine, l'isoleucine, et la méthionine ;  
et/ou  
35 - X<sub>3</sub> répond à la séquence y<sub>6</sub>y<sub>7</sub>y<sub>8</sub>y<sub>9</sub>y<sub>10</sub>y<sub>11</sub>y<sub>12</sub> dans laquelle y<sub>6</sub>  
représente un acide aminé choisi parmi l'alanine, la

sérine, la glycine, et la thréonine,  $Y_7$ ,  $Y_{11}$ , et  $Y_{12}$  représentent chacun la proline,  $Y_8$  représente un acide aminé choisi parmi la phénylalanine, le tryptophane, et la tyrosine,  $Y_9$  représente l'acide aspartique ou l'acide glutamique,  $Y_{10}$  représente un acide aminé choisi parmi la valine, la leucine, l'isoleucine, et la méthionine ; et/ou

-  $X_4$  répond à la séquence  $Y_{13}Y_{14}Y_{15}Y_{16}$ , dans laquelle  $Y_{13}$ ,  $Y_{14}$ ,  $Y_{15}$ ,  $Y_{16}$ , représentent chacun un acide aminé choisi parmi l'alanine, la sérine, la glycine, et la thréonine, ou bien  $Y_{14}$  représente un acide aminé choisi parmi l'alanine, la sérine, la glycine, et la thréonine,  $Y_{13}$  et  $Y_{15}$  représentent chacun un acide aminé basique, et  $Y_{16}$  représente l'acide aspartique ou l'acide glutamique ; et/ou

-  $X_5$  représente un acide aminé basique ; et/ou  
 -  $X_6$  répond à la séquence  $Y_{17}Y_{18}Y_{19}Y_{20}Y_{21}Y_{22}Y_{23}Y_{24}Y_{25}$ , dans laquelle  $Y_{17}$ ,  $Y_{19}$ ,  $Y_{21}$ , et  $Y_{23}$  représentent chacun un acide aminé choisi parmi la valine, la leucine, l'isoleucine, et la méthionine,  $Y_{18}$  représente la proline,  $Y_{20}$  et  $Y_{24}$  représentent chacun un acide aminé choisi parmi l'alanine, la sérine, la glycine, et la thréonine,  $Y_{22}$  représente un acide aminé choisi parmi la valine, la leucine, l'isoleucine, la méthionine, la phénylalanine, le tryptophane, et la tyrosine, et  $Y_{25}$  représente un acide aminé choisi parmi la phénylalanine, le tryptophane, et la tyrosine ; et/ou

-  $X_7$  répond à la séquence  $Y_{26}Y_{27}Y_{28}Y_{29}Y_{30}$  dans laquelle  $Y_{26}$  représente un acide aminé basique, ou un acide aminé choisi parmi la valine, la leucine, l'isoleucine, et la méthionine,  $Y_{27}$  représente l'asparagine ou la glutamine ou un acide aminé basique,  $Y_{28}$  représente la proline, et  $Y_{29}$  et  $Y_{30}$  représentent chacun un acide aminé choisi parmi l'alanine, la sérine, la glycine, et la thréonine.

4) Utilisation selon une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que le

polypeptide utilisé comme insecticide présente au moins 60% d'identité avec une quelconque des isoformes d'une albumine PA1b.

---

5) Utilisation selon la revendication 4, caractérisée en ce que ledit polypeptide est choisi dans le groupe constitué par les albumines PA1b et les leginsulines.

6) Utilisation selon une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que ledit polypeptide est utilisé pour protéger des graines de céréales ou des produits dérivés de celles-ci, contre des insectes ravageurs.

7) Utilisation selon une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que ledit polypeptide est utilisé pour protéger des plantes contre les insectes ravageurs des graines de céréales.

8) Utilisation selon une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que ledit polypeptide est utilisé à une concentration de 10µM à 100mM.

10) Utilisation selon une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisée en ce qu'elle comprend le traitement du produit à protéger avec une préparation comprenant ledit polypeptide.

11) Utilisation selon une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce qu'elle comprend la production d'une plante transgénique, transformée par au moins un gène codant pour ledit polypeptide, et exprimant ce dernier dans au moins un de ses tissus ou organes.

12) Utilisation selon la revendication 11, caractérisée en ce que ladite plante transgénique est une céréale.

13) Plante transgénique telle que définie dans une quelconque des revendications 11 ou 12.

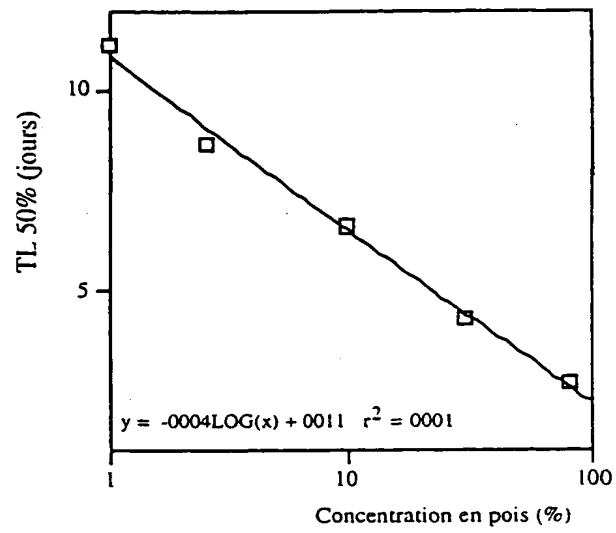


FIGURE 1

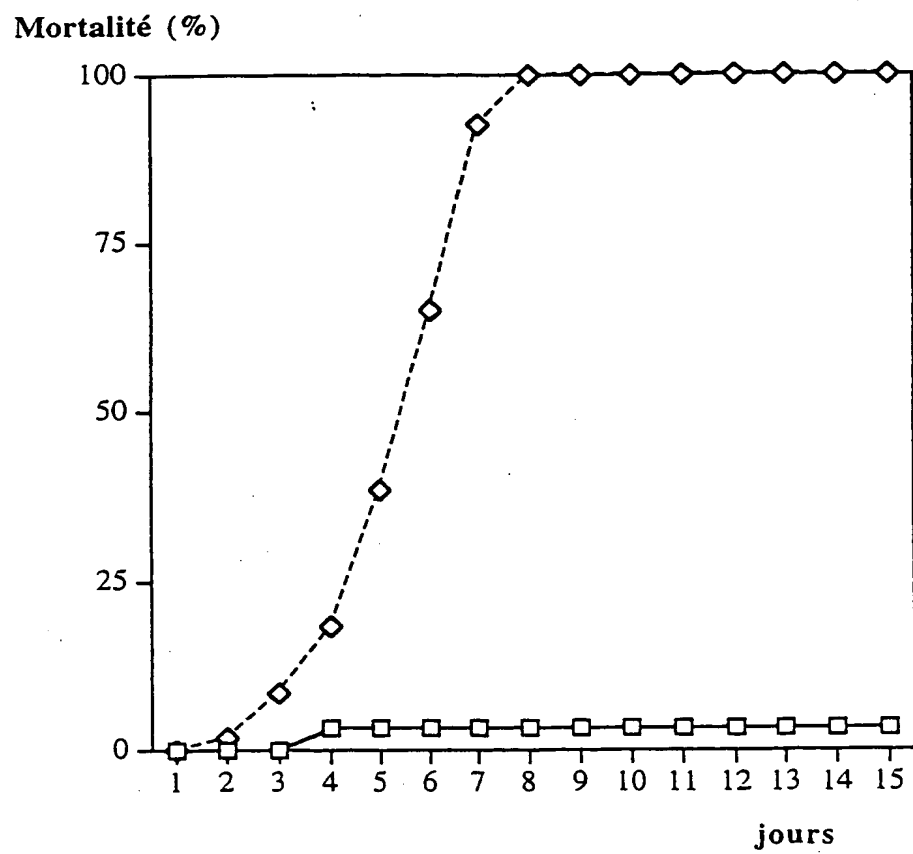


FIGURE 2

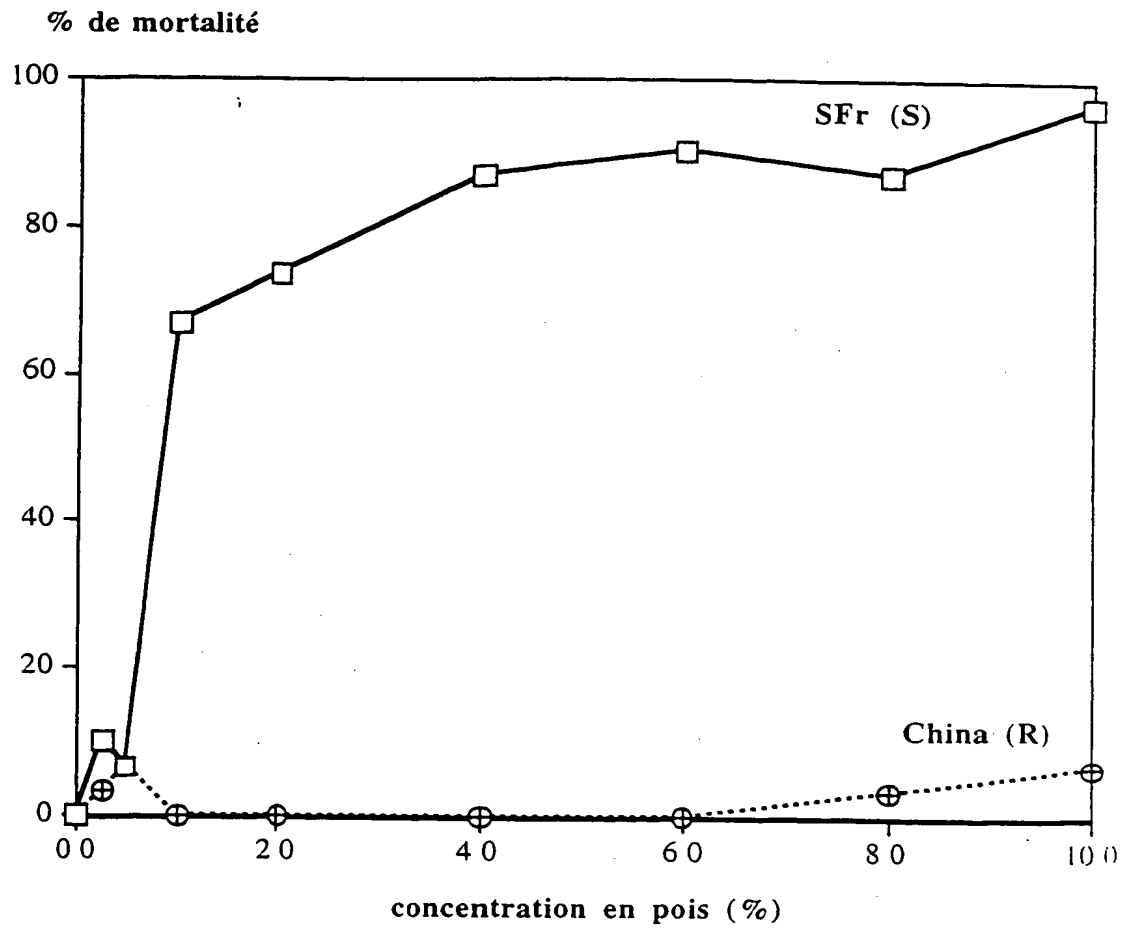


FIGURE 3

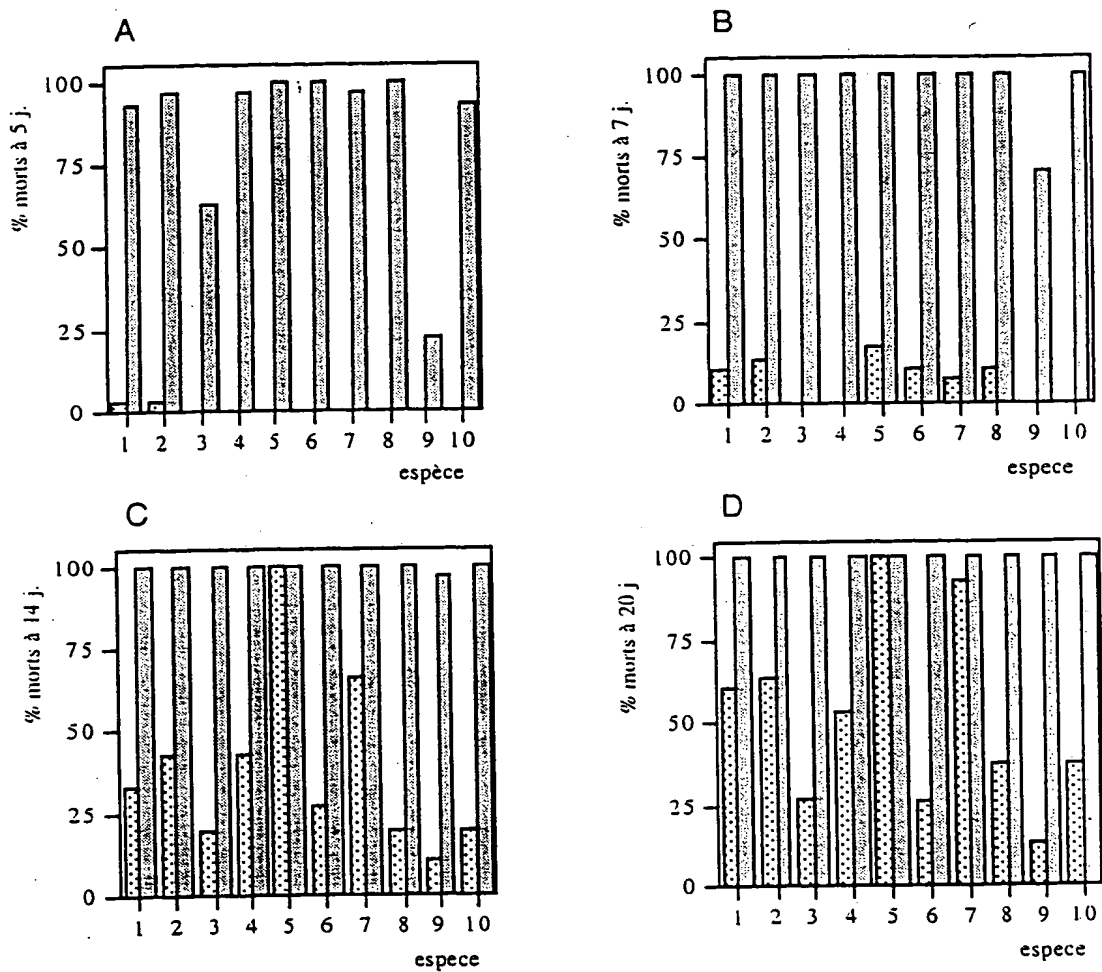


FIGURE 4

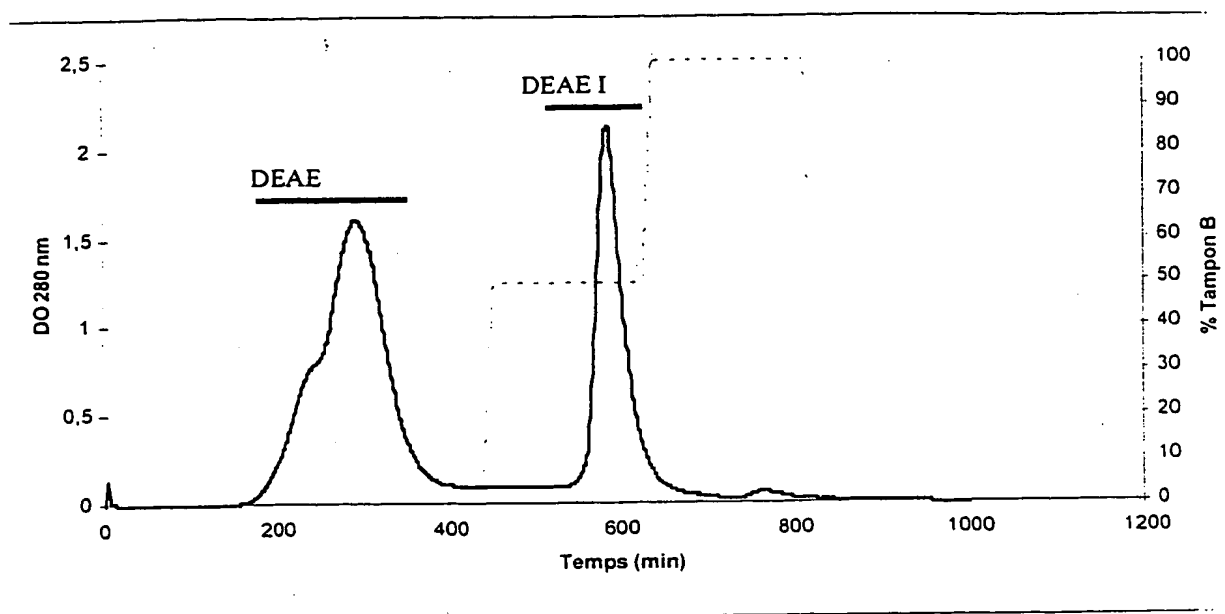


FIGURE 5



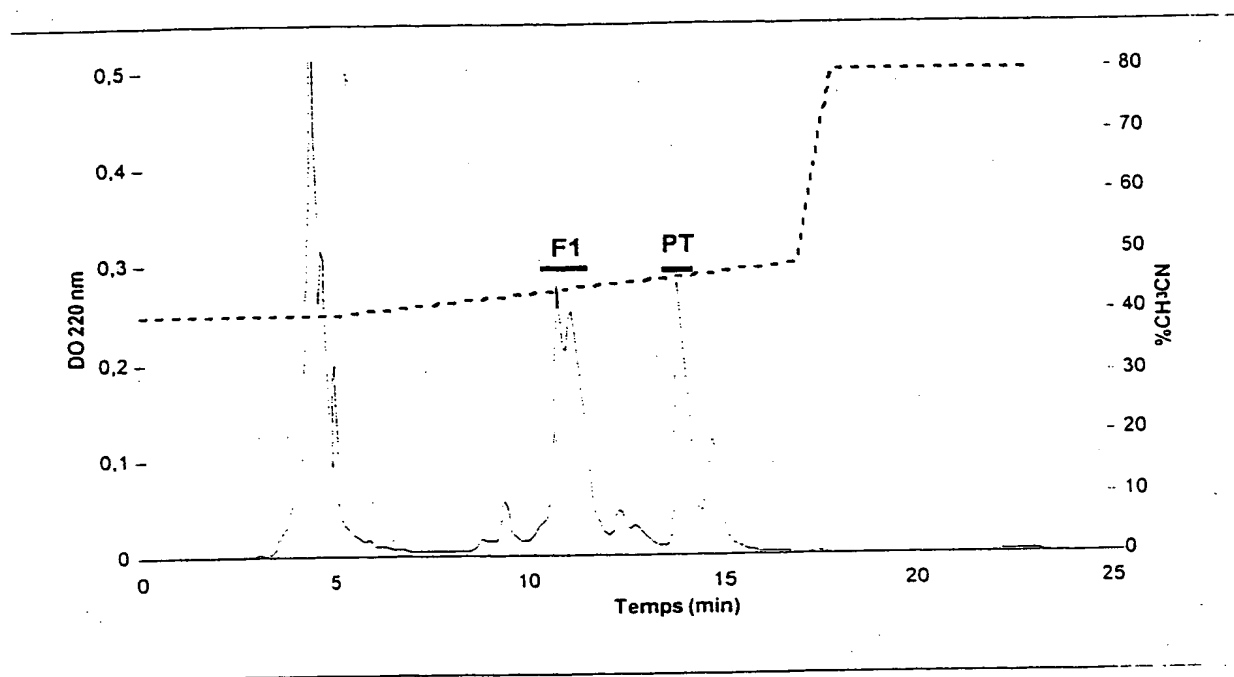


FIGURE 6

Protéine PT  
PA1b  
Leginsuline

1	10	20	30	37																																
A	S	C	N	G	V	C	S	P	F	E	M	P	P	C	G	T	S	A	C	R	C	I	P	V	G	L	V	I	G	Y	C	R	N	P	S	G
A	S	C	N	G	V	C	S	P	F	E	M	P	P	C	G	T	S	A	C	R	C	I	P	V	G	L	V	V	G	Y	C	R	N	P	S	G
A	D	C	N	G	A	C	S	P	F	E	V	P	P	C	R	S	R	D	C	R	C	V	P	I	G	L	F	V	G	F	C	I	H	P	T	G

FIGURE 7

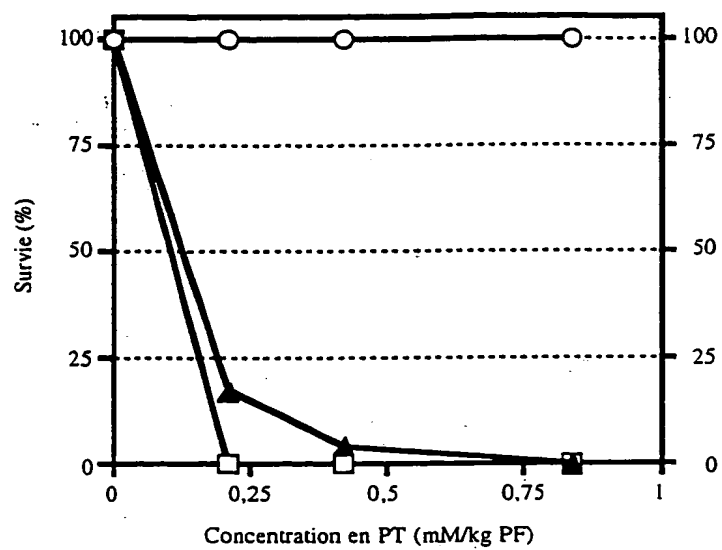


FIGURE 8

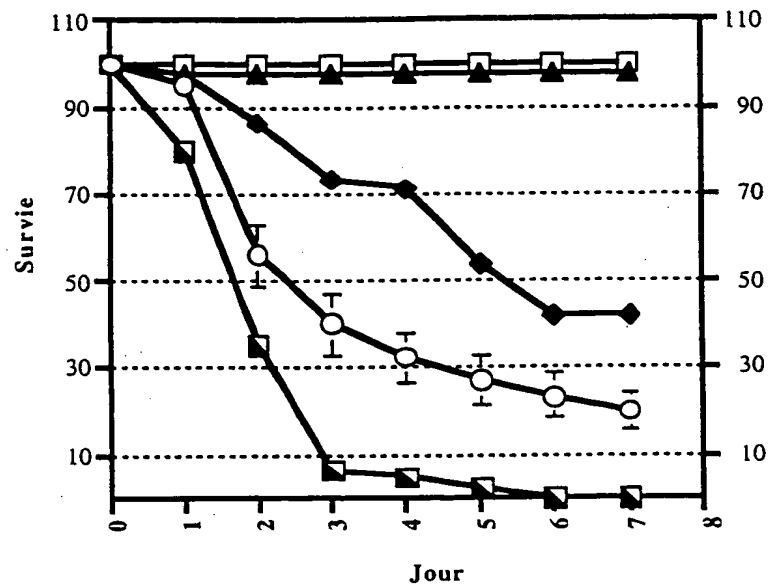


FIGURE 9